

①⑨ BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

①② **Offenlegungsschrift**  
①⑩ **DE 41 39 664 A 1**

⑤① Int. Cl. 5:  
C 07 H 21/04

②① Aktenzeichen: P 41 39 664.2  
②② Anmeldetag: 2. 12. 91  
④③ Offenlegungstag: 3. 6. 93

DE 41 39 664 A 1

⑦① Anmelder:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik  
GmbH, 4010 Hilden, DE

⑦④ Vertreter:

von Kreisler, A., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.;  
Werner, H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Fues, J.,  
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Böckmann gen. Dallmeyer,  
G., Dipl.-Ing.; Hilleringmann, J., Dipl.-Ing.; Jönsson,  
H., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Meyers, H., Dipl.-Chem.  
Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

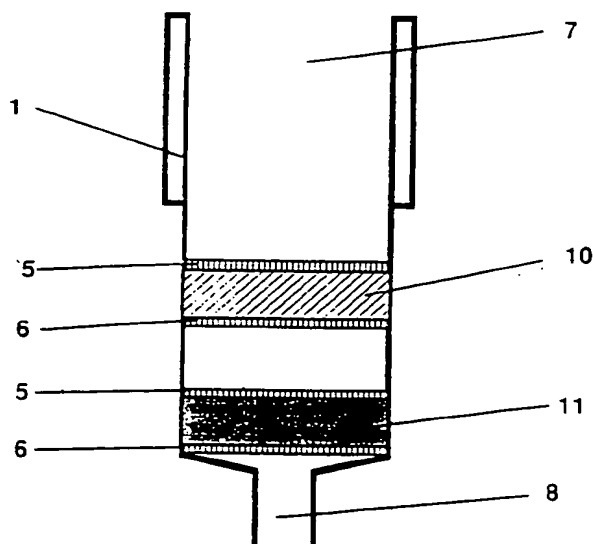
⑦② Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4300 Essen, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren

- ⑤⑦ Es wird ein Verfahren beschrieben zur Isolierung und  
Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen  
Quellen, wobei
- a) die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen  
und die Zelltrümmer entfernt werden oder sonstige nuklein-  
säurehaltige Proben mit Anionenaustauschern behandelt  
werden, und zwar in Pufferlösungen mit geringer Ionenstär-  
ke,
  - b) danach die Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionen-  
stärke von dem Anionenaustauscher desorbiert werden, um  
danach
  - c) im Puffer hoher Ionenstärke mit einem mineralischen  
Trägermaterial behandelt zu werden unter Adsorption der  
Nukleinsäure an die Oberfläche der mineralischen Träger-  
stoffe, woraufhin
  - d) eine Desorption der Nukleinsäure mit Wasser oder einer  
Pufferlösung mit geringer Ionenstärke erfolgt.
- Die Vorrichtung zur Durchführung des erfindungsgemäßen  
Verfahrens besteht aus einem Hohlkörper (1) mit einer  
Einlaßöffnung (7) und einer Auslaßöffnung (8), wobei im  
Hohlkörper (1) zwischen zwei Fixiereinrichtungen (5 und 6)  
ein pulverförmiges erstes Material auf Silicagelbasis (10)  
angeordnet ist und ein zweites Material (11) zwischen dem  
ersten Material (10) und der Auslaßöffnung (8) angeordnet  
ist, wobei die ersten und zweiten Materialien (10, 11)  
unterschiedliche Adsorptionscharakteristika für Nukleinsäu-  
ren aufweisen.



DE 41 39 664 A 1

Ionenaustauscher können poröse Trägermaterialien mit einer zur Wechselwirkung geeigneten inneren Oberfläche hoher Kapazität oder nicht poröse Trägermaterialien sein, die nur auf der äußeren Oberfläche eine Wechselwirkung mit dem zu trennenden Gemisch eingeht. Ganz besonders bevorzugt handelt es sich bei dem Anionenaustauscher um ein Material auf Basis von Silicagel, das eine Partikelgröße von 1 bis 250 µm, vorzugsweise 10 bis 50 µm und ganz besonders bevorzugt 15 bis 25 µm und einen Porendurchmesser von 1 bis 2500 nm, bevorzugt 10 bis 500 nm, besonders bevorzugt 200 bis 400 nm, aufweist. Als Anionenaustauschermaterial hat sich insbesondere ein Material mit hoher Oberflächenladung und hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren erwiesen. Die Modifizierung des Silicagels erfolgt vorzugsweise durch Silanisierung des Trägermaterials, wie beispielsweise in der EP-A 83 901 065, DE-A-39 35 098 und US-A-50 57 426 offenbart. In der EP-A 83 901 065 wird zum Beispiel gamma-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan und N,N-Dimethylaminoethanol zur Modifizierung des Trägermaterials verwendet.

Die Adsorption der Nukleinsäuren erfolgt unter Bedingungen, wie sie typischerweise bei niedrigen Salzkonzentrationen vorliegen. Vorzugsweise sind dies niedrigere Salzkonzentrationen als solche mit der die Nukleinsäuren von der Säule eluiert werden können. Je nach verwendeten Ionenaustauschermaterialien und pH-Werten kann die Salzkonzentration dabei 0,25 bis 1,5 M betragen.

Nach der Adsorption der Nukleinsäuren an dem Anionenaustauschermaterial kann sich mindestens ein Waschschritt mit Puffer geringer Ionenstärke anschließen.

Vorzugsweise befindet sich das Ionenaustauschermaterial dabei in einem überwiegend zylindrischen Hohlkörper einer Säule. Die Säule wird dann mit einer Salzlösung gewaschen, deren Ionenstärke so hoch wie möglich ist, ohne daß die erwünschte Nukleinsäure eluiert wird. Damit werden niedermolekulare und schwach geladene Verunreinigungen und Proteine ausgewaschen.

Danach wird die Nukleinsäure mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauschermaterial desorbiert, um dann unmittelbar im Elutionspuffer hoher Ionenstärke mit einem mineralischen Träger gebunden zu werden. Nukleinsäuren können in Gegenwart von chaotropen Salzen wie Natriumiodid, Natriumperchlorat an feingemahlenem Glas oder Silicagel gebunden werden, wenn man die Nukleinsäuren mit der feinen Glas- bzw. Silicagelsuspension versetzt und längere Zeit inkubiert, um eine Bindung der Nukleinsäure an das Silicagel zu ermöglichen (B. Vogelstein und D. Gillespie, 1979, Proc. Nat. Aca. Sci USA, 76, 615—19; Preparative and analytical purification of DNA from agarose; R. Yang, J. Li und B. Wu, 1979, Elution of DNA from agarose after gel electrophoresis, Methods Enzymol. 65, 176—182; M.A. Marko, R. Chipperfield und H.C. Birnboim, 1982, A procedure for the large scale isolation of highly purified plasmid DNA using alkaline extraction and binding to glass powder, Anal. Biochem, 121, 382—387).

Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt überraschenderweise, daß Nukleinsäure auch beim Passieren von sehr dünnen Schichten von Glas oder Silicagel effizient adsorbieren, obwohl die Verweilzeit nur 1—30 Sekunden beträgt. Es zeigt sich auch, daß eine Bindung in hohen Natriumchlorid- und Lithiumchloridkonzentrationen erfolgt und chaotrope Salze nicht notwendig sind. Auch ist bisher eine Kombination aus Anionenaus-

tauscher und Silicagel nicht beschrieben, wobei der Anionenaustauscher die Reinigung der Nukleinsäure übernimmt und bei den Konzentrationen von 0,25 M—1,5 M Salz zwar die Verunreinigungen, wie Metaboliten, Proteine und teilweise RNA, Polysaccharide entfernt werden, aber diese unter den gegebenen Bedingungen nicht an die nachgeschaltete Silicagelschicht adsorbieren können, und die Silicagelschicht die Entsalzungs- und Konzentrationsaufgabe übernimmt, wenn die Nukleinsäure im folgenden Schritt mit einer Salzkonzentration vom Anionenaustauscher eluiert wird, die hoch genug ist die Nukleinsäure an die Silicagelschicht adsorbieren kann.

Als Puffersalze in den angegebenen Konzentrationen kommen für den Adsorptionsschritt an den mineralischen Träger folgende in Betracht:

| Salz                 | Konzentration |
|----------------------|---------------|
| NaCl:                | 3—5 M         |
| NaClO <sub>4</sub> : | 5—7 M         |
| Gu—HCl:              | 5—7 M         |
| NaJ:                 | 3—5 M         |

Die Behandlung mit der Salzlösung kann einfach durch Auftropfen auf den Filter und Absaugen erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Silicagelschicht mit einer Perchloratlösung, pH 6,5 bis 8,5, insbesondere pH 7 bis 8, behandelt. Dies erfolgt zweckmäßig durch Pipettieren und Durchsaugen. Besonders bevorzugt wird hierzu eine Lösung, die 4 bis 8 M/l NaClO<sub>4</sub>, 5 bis 20 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8 und 0,5 bis 2 mM/l EDTA enthält, verwendet. Nach dem Entfernen der chaotropen Lösungen, insbesondere der Natriumperchloratlösung, wird vorzugsweise mit wäßrigem Ethanol nachgewaschen, zum Beispiel mit 50 bis 90%igem Ethanol.

Nach dem Trocknen der Filter erfolgt dann die Elution in üblicher Weise mit einer verdünnten wäßrigen Salzlösung, wie z. B. in Anal. Biochem. 101, 339—341 (1980) beschrieben. Ein bevorzugtes Elutionsmittel ist 0,5 bis 2 mM/l Tris-HCl, pH 7 bis 8, enthaltend 0,05 bis 0,2 mM/l EDTA, im folgenden als TE bezeichnet. Besonders bevorzugt wird ein pH-Wert von 7,5 bis 8,5. Ein anderes geeignetes Elutionsmittel sind verdünnte Detergenslösungen, wie zum Beispiel 0,1% SDS, die jedoch weniger bevorzugt werden.

Es hat sich gezeigt, daß außer Silicagel auch andere mineralische Träger zur Adsorption der Nukleinsäure geeignet sind. In einer bevorzugten Form wird jedoch Silicagel der Partikelgröße 1 bis 250 µm, bevorzugt 5 bis 50 µm, insbesondere 15—25 µm, eingesetzt. Die Entsalzungsschicht kann als eine lose geschüttete Schicht, die zwischen zwei PE-Fritten eingeschlossen ist, in der Extraktionssäule eingesetzt werden. Eine andere Ausführungsform beinhaltet die Anwendung der mineralischen Träger in Membranform nach EP 03 23 055 (07.12.1988, 3M, Composition Chromatographic Article).

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren verschiedenster Provenienz getrennt und präpariert werden. Dabei ist es gleichgültig, ob die Nukleinsäuren aus Bakterien, Zellkulturen, Blut, Gewebe, Urin, Viren oder aus Amplifikationsreaktionen, wie PCR (Polymerase Chain Reaction), SSSR (Self-Sustained-Sequence Replication), Ligase-Chain-Reaktion und ähnlichen Reaktionen stammen, oder ob es sich um markierte Nukleinsäuren, wie in Biotin markierte, fluores-

auch 12mal aneinandergesetzt hergestellt werden, wobei 96 Proben prozessierbar werden. Der große Vorteil ist dann gegeben, wenn das international standardisierte Mikrotiter-Format verwendet wird.

Die Fig. 7 beschreibt eine Vorrichtung, die in einem zylindrischen Hohlkörper 1 mit Einlaßöffnung 7 und Auslaßöffnung 8 ein Anionenaustauschermaterial 10 zwischen zwei Einrichtungen 6 und 5 fixiert enthält. Darauf ist aufgesteckt ein weiterer zylindrischer Hohlkörper in dessen Lumen verschiedene Filterschichten angeordnet sind. Die Filterschichten 20, 21, 22 können aus gesintertem Polyethylen, Polypropylen, PTFE, Glas, Silicagel, Aluminiumoxid oder geschütteten Diatomenerde, z. B. Cellit oder Silicagel bestehen. Aber auch verwebtes, verklebtes Vlies in Form von Polypropylen, Polyester, Glasfasern und Silica kommen in Betracht. Die Porosität der einzelnen Schichten beträgt vorzugsweise 15 µm bis 500 µm in einer Dicke von 0,1 mm bis 10 mm. Die Porengröße der Filterschicht wird, in Fließrichtung gesehen, von Schicht zu Schicht geringer. In einer typischen Ausführungsform beträgt die Größe der Poren in der Schicht 20 etwa 100 bis 300 µm, in der Schicht 21 30 bis 100 µm und in der dritten Filterschicht 5 bis 30 µm.

Die Fig. 8 zeigt eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Vorrichtung nach Fig. 7, wobei als, in Fließrichtung gesehen, oberste Filterschicht 23 eine hydrophobe Schicht eingesetzt wird. Die hydrophobe Trennschicht 23 verhindert die unerwünschte Penetration des rohen Zell-Lysats in die Filterschicht vor Beginn der eigentlichen Filtration. Die hydrophobe Trennschicht 23 besteht vorzugsweise aus versponnenem oder gesintertem Polypropylen, Polyethylen, Polyester oder Polytetrafluoroethylen (PTFE)-Fasern, in einer Porosität von 10 µm bis 500 µm und vorzugsweise eine Dicke von 0,1 bis 5 mm.

Die Fig. 9 beschreibt eine Filtrationsvorrichtung, die ähnlich aufgebaut ist, wie die in den Fig. 7 und 8 beschriebenen, mit dem Unterschied, daß verschiedene Filterschichten mit abnehmender Porengröße in einer einzigen Filterschicht 12 mit kontinuierlich abnehmender Porengröße verbunden sind. Die asymmetrische Filterschicht 12 ist vorzugsweise mit einer hydrophoben Filterschicht 23 am oberen Ende, in Fließrichtung gesehen, versehen. Die asymmetrische Filterschicht 12 besteht vorzugsweise aus versponnenem Polypropylen oder Polyesterfasern; kommerziell erhältlich sind Profile, beispielsweise von Pall Filtertechnik, Dreieich, Frankfurt, mit Porositätsabstufungen von 500 bis 50 µm, 100 bis 10 µm, 50 bis 5 µm sowie 10 bis 0,1 µm. Die Dicke der asymmetrischen Filterschicht sollte vorzugsweise 1 mm bis 10 mm betragen.

Die Fig. 10 beschreibt Filtrationseinrichtungen zur Abtrennung von Nukleinsäuren im erfindungsgemäßen Sinne wobei auf die Filterkonfigurationen der Fig. 9 zurückgegriffen wird und wobei eine asymmetrische Filterschicht mit einer hydrophoben Filterschicht 23 versehen ist. Im Hohlkörper 1 befindet sich anstelle des Anionenaustauschers 10 ein mineralischer Träger 11, der in der Lage ist, Nukleinsäuren in hochkonzentrierten Salzlösungen zu adsorbieren.

Die Fig. 11 beschreibt eine Konfiguration in einer Verbindung der Fig. 9 und 10. Dabei wird der Vorrichtung, die in Fig. 2 beschrieben wird, lediglich ein Filteraufsatz bestehend aus einem asymmetrischen Filter 12 und einer hydrophoben Filterschicht 23 zugeordnet etwa durch Einstecken einer entsprechend ausgebildeten Kartusche.

Sämtliche Einzelvorrichtungen, die in den Fig. 1 bis 5

und 7 bis 11 näher beschrieben worden sind, lassen sich in einem Mikrotiterstreifen bestehend aus 8 aneinandergesetzten Einzelvorrichtungen anordnen. Beispielshaft ist dies noch einmal in den Fig. 12 bis 14 dargestellt.

Die Fig. 12 zeigt eine Filtrationsvorrichtung mit Anionenaustauscher wobei ein Mikrotiterstrip oder eine Mikrotiterplatte mit 8 bzw. 8 × 12 Vertiefungen. In der Vorrichtung gemäß Abb. 12 befindet sich eine asymmetrische Filtrationseinrichtung in einer aufsteckbaren Kartusche auf dem zylindrischen Hohlkörper 1, der eine Anionenaustauscherschicht zwischen den Einrichtungen 5, 6 fixiert enthält.

Die Fig. 13 betrifft eine Filtrationsvorrichtung, die anstelle des Anionenaustauschermaterials ein mineralisches Trägermaterial besitzt, welches in der Lage ist, Nukleinsäuren in hohen Salzkonzentrationen zu adsorbieren. Vorzugsweise befindet sich eine Silicagelschicht 11 angeordnet zwischen zwei Einrichtungen 5 und 6.

Die Fig. 14 zeigt eine Kombination der Anordnung gemäß Fig. 2 sowie einer asymmetrischen Filterschicht mit hydrophober Filterschicht, die über dem Hohlkörper 1, in Fließrichtung der Probe gesehen, angeordnet ist.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung, insbesondere die in Fig. 3 oder 4 näher erläuterte Vorrichtungen, sind besonders vorteilhaft, das die Elution der Nukleinsäure aus dem zweiten Material 11 mit nur sehr geringen Flüssigkeitsmengen gewährleistet.

Der Durchfluß der Probe durch die erfindungsgemäße Vorrichtung wird grundsätzlich durch die Schwerkraft bewirkt, jedoch kann zur Beschleunigung der Reinigung und Trennung der Nukleinsäuren ein Überdruck an der Öffnung 7 bzw. ein Unterdruck an der Öffnung 8 bzw. 18 angelegt werden. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäßen Vorrichtung verwendet als asymmetrische Filter solche aus gesintertem Glas mit abnehmender Porengröße oder übereinandergeschichtete Kunststoffmembranen mit abnehmender Porengröße in Fließrichtung der Probe durch den Hohlkörper.

Nukleinsäuren aus Zellen und anderen Quellen können ohne Zentrifugation, Phenol/Chloroform-Extraktion und ohne Alkoholfällung erhalten werden, wobei die Nukleinsäure am Ende des Verfahrens in konzentrierter Form in Wasser oder Puffer niedriger Salzkonzentration vorliegt und somit direkt für anschließende enzymatische Reaktionen einsetzbar ist. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß der Einsatz von teuren Labor-einrichtungen vermieden werden kann. Die Elution kann beispielsweise durch Schwerkraft bewirkt werden und muß nicht mittels sogenannter HPLC-Geräte durchgeführt werden.

Die Herstellung einer Silicagel-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch, daß ein Polypropylen-Gefäß passend in ein handelsübliches 1,5 ml Zentrifugengefäß, unten mit einer 50 µm Polyethylen-Fritte (poröse Filterschicht aus Polyethylen, 1,5 mm dick) verschlossen wird und mit 50 mg Silicagel (Lichrosphere Si 100, 16–24 µm; Merck, Darmstadt, FRG) überschichtet. Diese Silicagelschicht wird mit einer zweiten porösen Polyethylen-Fritte verschlossen und die zweite Fritte mit 100 mg Silicagel-Anionenaustauscher (Qiagen, Fa. Diagen, Düsseldorf, FRG), Partikelgröße 16 bis 23 µm überschichtet und abschließend mit einer dritten porösen Polyethylen-Fritte verschlossen.

Die Herstellung einer Agarose-Anionenaustauscher/Silicagel-Extraktions-Säule erfolgt vorzugsweise dadurch,

säule wird zweimal mit 1 ml PBS-Puffer nachgewaschen. Die eingefangenen Leukozyten werden mit 10% Tween 10, 15 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Die Zellbruchstücke und Proteine werden mit zweimal 1 ml 1 M Guanidin-HCl, pH 7,0 ausgewaschen und die DNA mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 50 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Säule eluiert.

#### Beispiel 5

##### Präparation, Entsalzung und Konzentration von DNA im Mikrotiterformat

96 × 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL 1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 × YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2500 g pelletiert. Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNaseA in die Mikrotiterplattenvertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einen Vibrations-Schüttler resuspendiert.

Die Zellen werden durch die Zugabe von je 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln lysiert. Anschließend werden je 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure, pH 5,5–6,0 Neutralisationspuffer zugegeben, die einzelnen Näpfe mit einer Kappe verschlossen und gemischt. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wird die Probe 30 Minuten bei 3000 g zentrifugiert, um die Zellbruchstücke und das präzipitierte SDS zu pelletieren. Der Überstand wird mit einer 8-Kanal-Multichannel-Pipette vorsichtig abgehoben und in die 96er Mikrotiterplatte mit einer DEAE-Silicagelmembrane und Silicagelmembrane pipettiert. Nach der Überführung aller 96 Proben werden die Proben durch Anlegen eines Vakuums an eine Filtrierapparatur durch die Mikrotiterplatte gesaugt. Die DNA wird dabei an die Anionenaustauscherschicht adsorbiert, wohingegen unter diesen speziellen Bedingungen Proteine, RNA und Metabolite nicht adsorbiert werden.

Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0, 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub> gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Anschließend wird die von Salz befreite DNA in konzentrierter Form mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 von der Silicagel-Schicht in eine weitere Mikrotiterplatte eluiert.

Die Herstellung der Zell-Lysate mit Hilfe der Zentrifugation ist ein langwieriges und aufwendiges Verfahren. Die Limitierung ist vor allem dann gegeben, wenn viele Proben routinemäßig präpariert werden müssen. Die Zentrifugation hat den Nachteil, daß sie sich nicht automatisieren läßt.

Ein weiterer Gegenstand (und Verfahren) der Erfindung ist eine Vorrichtung und ein Verfahren zur automatischen Durchführung des Verfahrens ohne Zentrifugation in Form einer Filtrationseinheit, die der eigentlichen Reinigung der Nukleinsäure vorgeschaltet ist.

Dabei wird die Probe nach bekannter Weise mit Pro-

teinasen, Detergentien und/oder Temperatur oder Alkali lysiert. Dieses rohe Lysat wird direkt auf den Filtrationsaufsatz dekantiert, überführt oder pipettiert. Die Filterschicht des Filtrationsaufsatzes ist so aufgebaut, daß ein Verstopfen der Filter durch die Zelltrümmer, ausgefallene Proteine oder Detergentien vermieden wird. Das Zell-Lysat wird durch die Filterschicht mit einem Stempel oder Überdruck durchgedrückt oder unter Anlegen eines Vakuums durchgesaugt. Dabei werden alle ungelösten Bestandteile zurückgehalten und das klare Lysat tropft direkt auf die Adsorptionsschicht. Durch die Wahl der geeigneten Adsorptionsbedingungen wird die Nukleinsäure an der Adsorptionsschicht adsorbiert. Die Filtrationseinheit mit dem Filterkuchen wird von der Adsorptionseinheit abgetrennt und/oder verworfen und für die Analyse des Filterkuchens aufgehoben. Die Adsorptionseinheit wird mit geeigneten Lösungsmitteln oder Puffern nachgewaschen, um unerwünschte Bestandteile zu entfernen und die erwünschte Probe wird zum Schluß mit einem geeigneten Elutionsmittel eluiert.

Beispielsweise läßt sich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren Plasmid DNA ohne eine Klar-Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge präparieren. 96 × 1 ml Kulturen von Plasmid pBluescript in XL1 Blue E.coli Zellen, werden im 2 × YT Medium 18 Stunden bei 37°C in einer Mikrotiterplatte mit 1,5 ml Vertiefungen (Fa. Beckmann, München) kultiviert. Die Zellen werden in einer Mikrotiterzentrifuge für 10 Minuten bei 2500 g pelletiert.

Mit einer 8-Kanal Multichannel-Pipette (Fa. Matrix Technologies, Lowell, MA, USA) werden je 0,25 ml 50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNaseA in die Mikrotitervertiefungen pipettiert und die Zellen 5 Minuten auf einem Vibrations-Schüttler resuspendiert. Die resuspendierten Zellen werden in das Probenreservoir des Filtrationsaufsatzes überführt und mit 0,25 ml 0,2 M NaOH/1% SDS versetzt. Die Probe wird 5 Minuten auf einen Vibrations-Schüttler geschüttelt oder mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen und gemischt, oder durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur zur Lyse wird zur Neutralisation der NaOH und Präzipitation des SDS 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zugegeben und nach einem der oben beschriebenen Verfahren gemischt. Dieses rohe Zell-Lysat wird nun statt einer Zentrifugation auf einer Vakuumkammer bei 10 mbar–800 mbar Vakuum durch die Filtrations-schicht gesaugt. Eine asymmetrische oder eine stufenweise Porosität im Bereich 200 µm bis 5 µm aufweisende Filterschicht mit einer Dicke von 2–10 mm hält die Zellbruchstücke und anderen ungelösten bzw. präzipitierten Bestandteile zurück ohne zu verstopfen. Das Plasmid DNA enthaltende, klare Zell-Lysat tropft durch die Filterschicht auf die Adsorptionsschicht (Anionenaustauscher oder Silicagel) und die DNA wird adsorbiert, wogegen Proteine, RNA und andere zelluläre Metabolite unter den gegebenen Salzbedingungen nicht binden. Die Filtration ist nach ca. 10 bis 60 Sekunden beendet. Der Filteraufsatz wird abgenommen und zusammen mit dem Filterkuchen verworfen.

Die gebundene DNA wird mit 1 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl pH 7,0 und 2 mal mit 1 ml 1,5 M NaClO<sub>4</sub>, 10 mM Na-Acetat, pH 6,5 gewaschen und mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 50 mM Tris-HCl, pH 7,0 von Anionenaustauscher eluiert und nach Passieren der Trennschicht aus einem Nylonnetz oder PP-Vlies unter

in die Vorrichtung nach Fig. 14 überführt. Zur Zell-Lyse werden 0,25 ml 0,2 M NaOH, 1% SDS zur Zellsuspension in die Filtrationsvorrichtung gegeben, die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat, 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar–800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen. Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H<sub>2</sub>O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1–2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 8 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert.

#### Beispiel 10

Präparation von 8 × 1 ml M13 DNA mit einer Vorrichtung nach Fig. 13

8 × 1 ml M13 Phagensuspension werden mit 0,5 ml 30% PEG 6000, 1,5 M NaCl versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben werden auf eine Vorrichtung nach Abb. 13 überführt und das Phagenlysat wird auf einer Vakuumkammer direkt durch eine Vorrichtung nach Fig. 13 gesaugt und filtriert. Das Phagenpellet wird durch das Durchsaugen von 7 M Guanidin-HCl, pH 7,0 lysiert und die DNA gleichzeitig an die Silicagelschicht 11 adsorbiert. Die Extraktionssäule wird 2 mal mit 1 ml 7 M Guanidin-HCl, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 gewaschen, um Proteine zu entfernen. Die Extraktionssäule wird mit 0,0 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 100 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen und für 1–2 Minuten Luft durchgesaugt. Zum Schluß wird die DNA mit 50 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen.

Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Beispiel 11

Präparation von 8 × 12 Plasmid DNA mit einer Vorrichtung nach Fig. 14

96 mal 1,5 ml XL Blue E.coli Kulturen mit pUC 18 Plasmid DNA in LB-Medium werden 5 Minuten bei 2.500 g zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Die Zell-Pellets werden in 0,25 ml 50 ml Tris-HCl, 10 mM

MEDTA, pH 8,0, 100 µg/ml RNase A resuspendiert und in die Vorrichtung mit einem Stopfen oder einer Klebefolie verschlossen, vorsichtig gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wird 0,25 ml 3 M K-Acetat 2 M Essigsäure zur Neutralisation zugegeben, gemischt und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die ganze Vorrichtung wird auf eine Vakuum-Kammer aufgesetzt und das Zell-Lysat mit 20 mbar–800 mbar durch die Vorrichtung gesaugt. Alternativ kann die Probe mit Überdruck durch die Filtrationsschichten gedrückt werden. Nach der Filtration wird die Filtrationsvorrichtung abgenommen und der Filterkuchen mit den Zellbruchstücken, den denaturierten Proteinen und dem ausgefallenen SDS verworfen. Die Extraktionssäule wird 0,8 ml 1 M NaCl, 15% Ethanol, 50 mM MOPS, pH 7,0 und mit 0,8 ml 1 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 gewaschen, um RNA und Proteine zu entfernen. Die DNA wird mit 7 M NaClO<sub>4</sub>, 15% Ethanol, 10 mM Na-Acetat, pH 7,0 von der Anionenaustauscher-Schicht 10 eluiert und dabei direkt an die Silicagel-Schicht 11 gebunden. Die Extraktionssäule wird mit 0,8 ml 70% Ethanol, 100 mM NaCl, 10 mM Na-Acetat pH 7,0 und mit 0,8 ml 90% Ethanol/Wasser gewaschen.

Die in der Extraktionsschicht vorhandenen Ethanol-H<sub>2</sub>O-Reste werden durch ein Durchsaugen von Raumluft durch ein Vakuum für 1–2 Minuten verflüchtigt. Anschließend werden die 96 Proben mit je 50 µl 1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0 eluiert und in neuen 1,5 ml Röhrchen aufgefangen. Die eluierte DNA kann direkt in einer enzymatischen Reaktion, wie zum Beispiel Restriktionsspaltung, Markierung, Sequenzierung oder Amplifikation eingesetzt werden.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei

- a) die Nukleinsäuren enthaltenden Zellen aufgeschlossen und die Zellrümpfe entfernt werden oder sonstige nukleinsäurehaltige Proben mit Anionenaustauschern behandelt werden, und zwar in Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke,
- b) danach die Nukleinsäuren mit einem Puffer hoher Ionenstärke von dem Anionenaustauscher desorbiert werden, um danach
- c) im Puffer hoher Ionenstärke mit einem mineralischen Trägermaterial behandelt zu werden unter Adsorption der Nukleinsäure an die Oberfläche der mineralischen Trägerstoffe, woraufhin
- d) eine Desorption der Nukleinsäure mit Wasser oder einer Pufferlösung mit geringer Ionenstärke erfolgt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Verfahrensschritte b) und c) unmittelbar aufeinanderfolgend durchgeführt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 und/oder 2, wobei Zentrifugations- oder Filtrationsschritte dem Schritt a) vorgeschaltet werden, um nicht gelöste Bestandteile mechanisch abzutrennen.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei zwischen den Schritten a) und b) ein oder mehrere Waschschritte mit Pufferlösungen mit geringer oder pro Waschschritt steigender Ionenstärke erfolgen.

33. Verwendung der gemäß einem der Verfahren 1 bis 15 gewonnen Nukleinsäuren in einer der folgenden enzymatischen Reaktionen, wie Restriktionsabbaueung, Sequenzierung, Amplifikation, Markierung. 5

34. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei

a) die Zelltrümmer oder sonstige Partikel durch eine Filterschicht mit, in Fließrichtung der Probe gesehen, abnehmender Porengröße entfernt werden. 10

b) wobei dann das Effluat mit einem Anionenaustauscher in Pufferlösungen mit geringer Ionenstärke behandelt wird. 15

35. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 34, wobei mindestens eine Filterschicht (12, 20, 21 oder 22) im Lumen eines im wesentlichen zylindrischen Hohlkörpers (1) vor einer zwischen zwei Einrichtungen (5, 6) fixierten Schicht (10) mit Anionenaustauschereigenschaften, aus der Richtung der Einlaßöffnung (7) her gesehen, angeordnet ist. 20

36. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren aus Zellen oder anderen Quellen, wobei 25

a) die Zelltrümmer oder sonstige Partikel durch eine Filterschicht mit, in Fließrichtung der Proben gesehenen, abnehmenden Filterporengrößen entfernt werden. 30

wobei  
b) das Effluat danach mit einem mineralischen Träger in Pufferlösungen hoher Ionenstärke behandelt wird.

37. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 36, wobei mindestens eine Filterschicht (12, 20, 21 oder 22) im Lumen eines im wesentlichen zylindrischen Hohlkörpers (1) vor einer zwischen zwei Einrichtungen (5, 6) fixierten Schicht (11), die Nukleinsäuren bei hoher Ionenstärke der entsprechenden Lösung zu binden vermag, aus der Richtung der Einlaßöffnung (7) her gesehen, angeordnet ist. 35 40

---

Hierzu 14 Seite(n) Zeichnungen 45

50

55

60

65

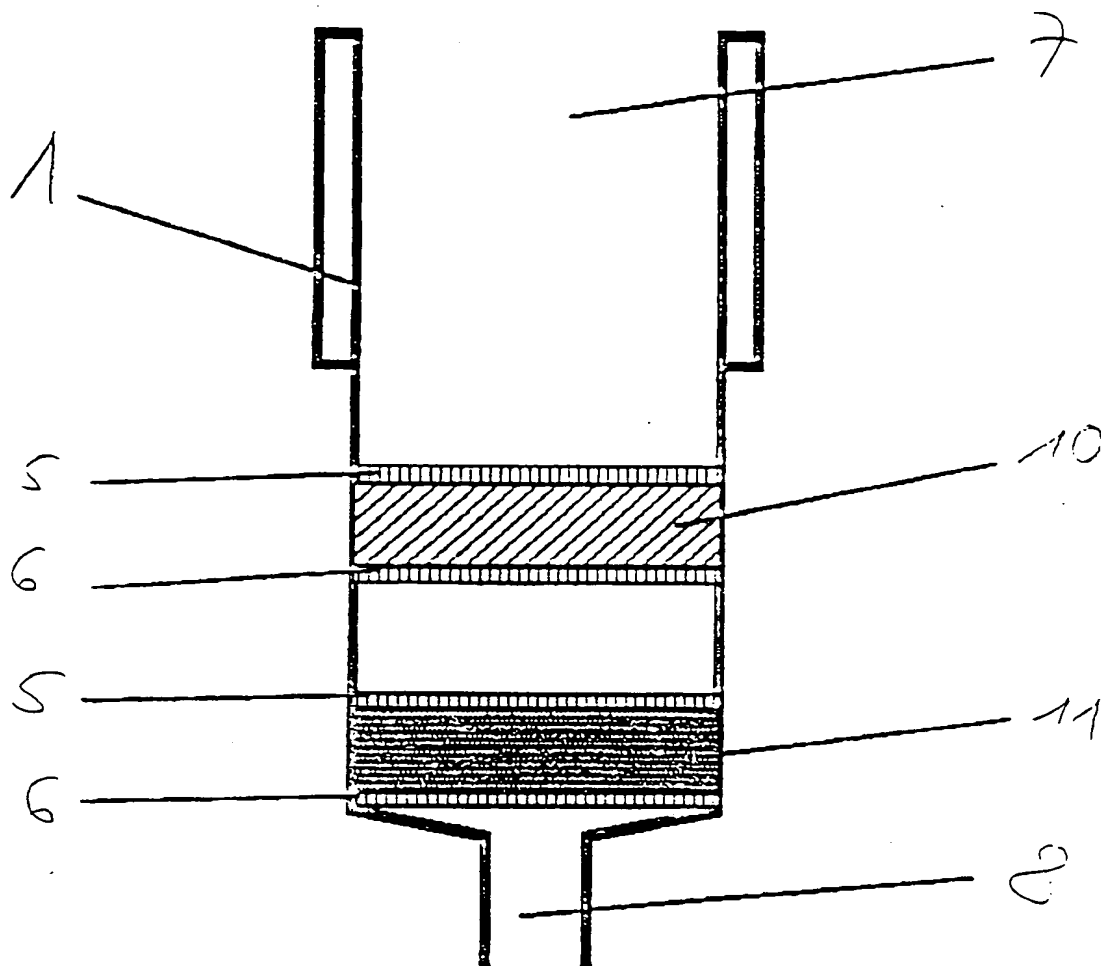


Fig 1

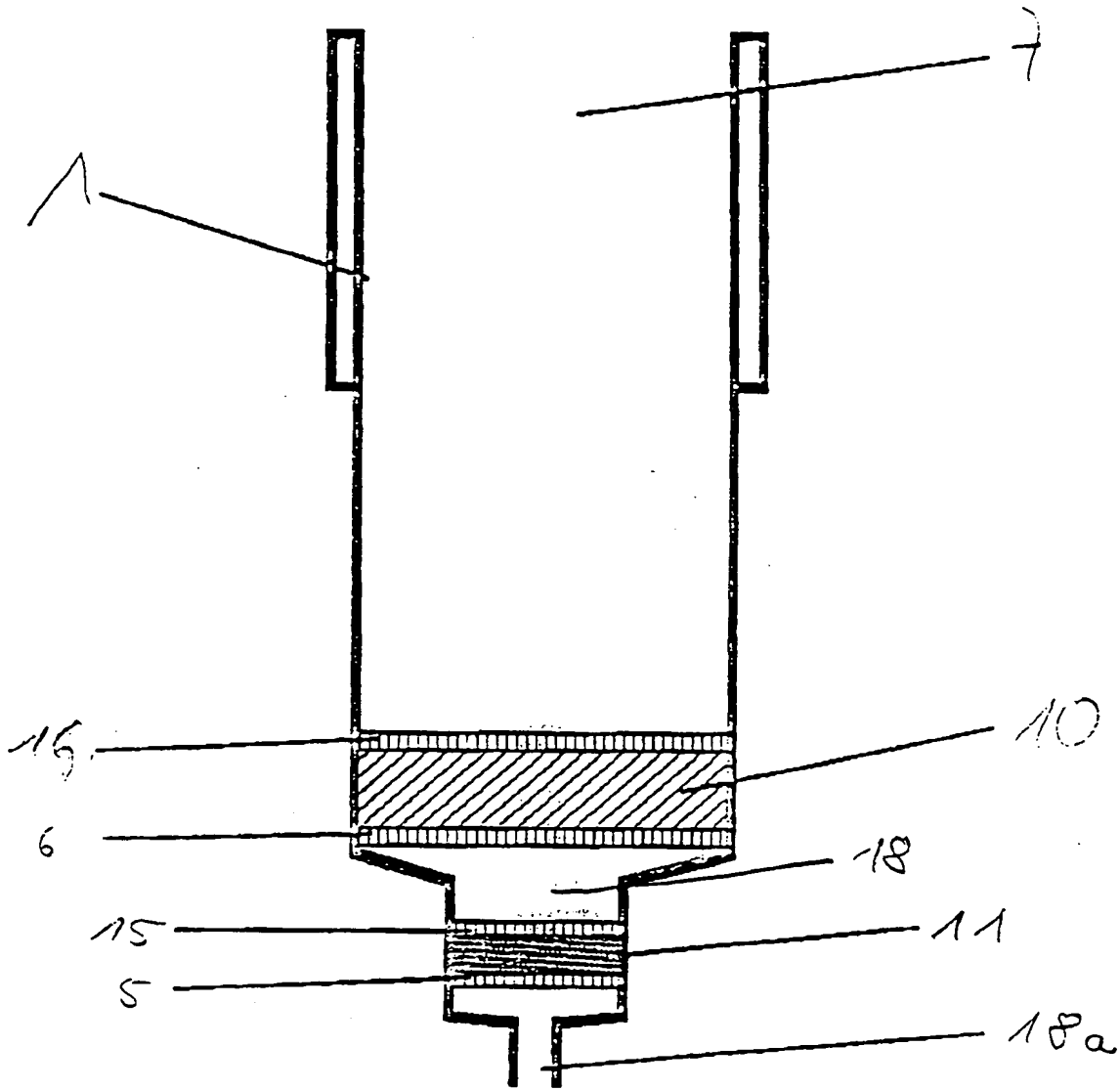


Fig. 3



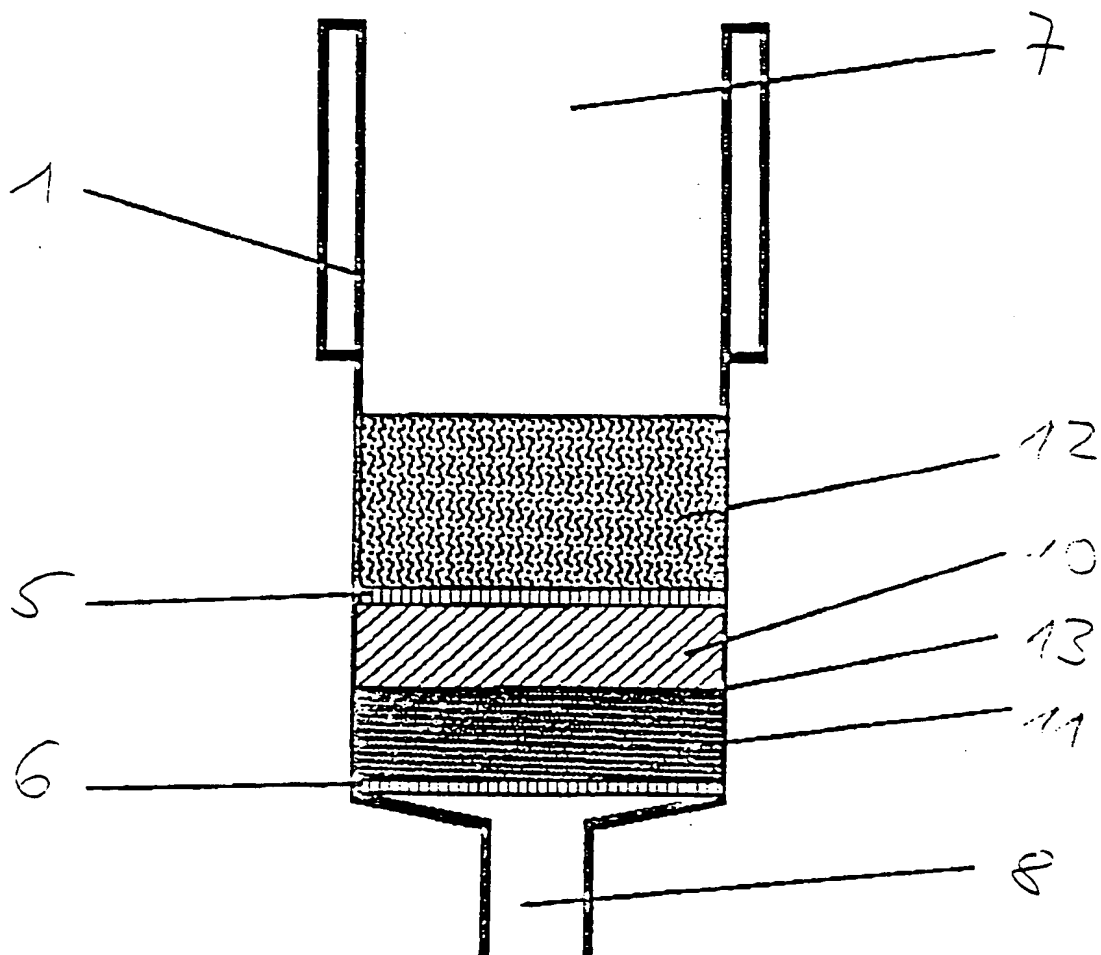
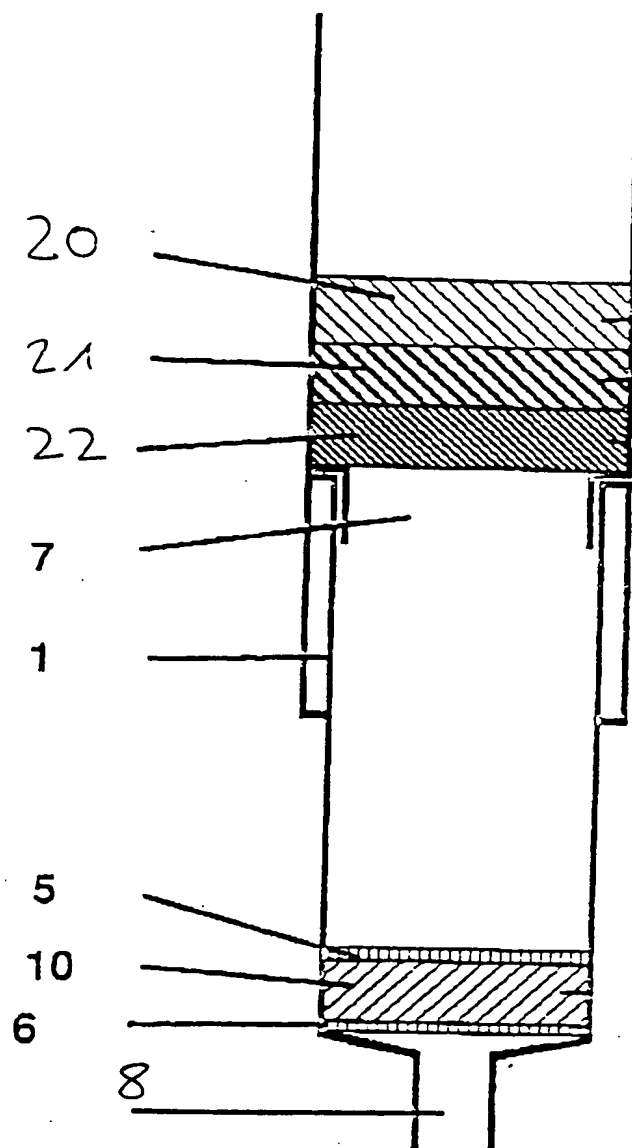


Fig. 5



Flg : 7

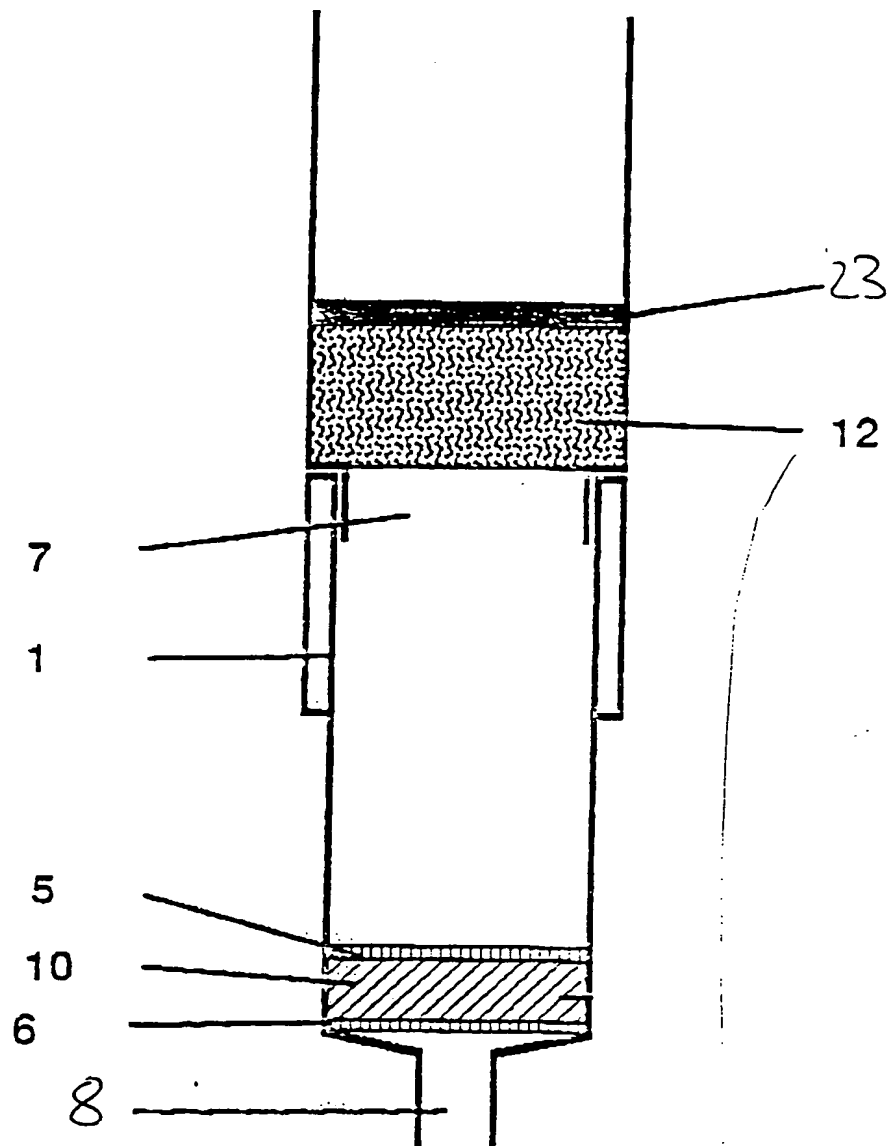


Fig : 9

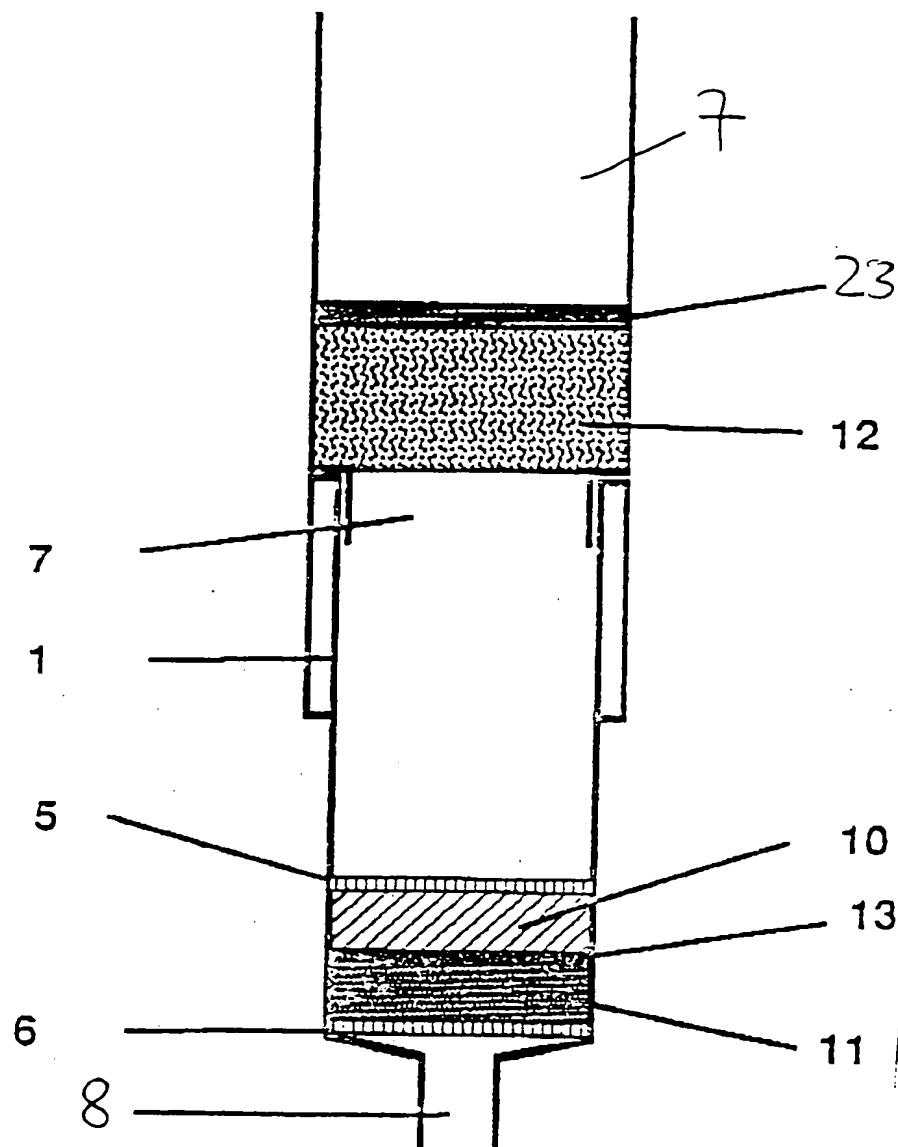


Fig : 11

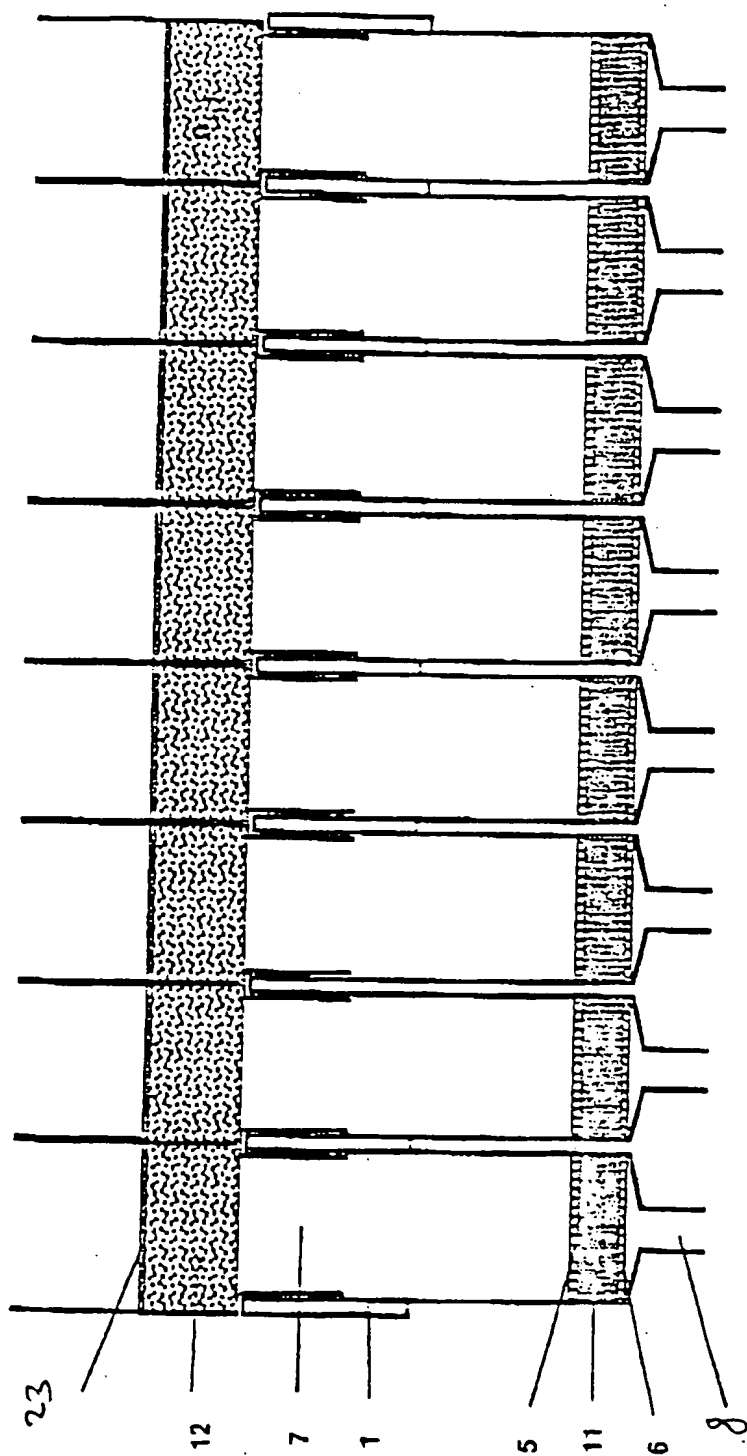


Fig : 13